



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

0 073 513
A1

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 82107972.0

51 Int. Cl.: **G 01 N 33/52, G 01 N 31/22,**
G 01 N 21/07

22 Anmeldetag: 30.08.82

30 Priorität: 01.09.81 DE 3134611

71 Anmelder: **Boehringer Mannheim GmbH,**
Sandhoferstrasse 118, D-6800 Mannheim 31 (DE)

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 09.03.83
Patentblatt 83/10

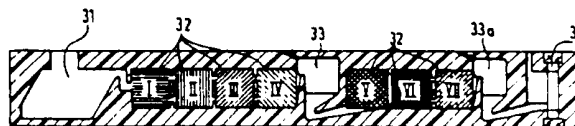
72 Erfinder: **Klose, Sigmar, Dr., Breitenloh 7,**
D-8131 Berg 2 (DE)
Erfinder: **Stähler, Fritz, Dr., Heimgartenstrasse 4,**
D-8132 Tutzing (DE)

84 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU**
NL SE

74 Vertreter: **Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al,**
Patentanwälte Dipl.-Ing. H. Weickmann Dipl.-Phys.Dr. K.
Fincke Dipl.-Ing. F.A. Weickmann Dipl.-Chem. B. Huber
Dr.-Ing. H. Liska Möhlstrasse 22,
D-8000 München 86 (DE)

54 Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen und hierfür geeignetes Mittel.

57 Zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu einer Meßstelle transportiert wird, transportiert man die Probelösung zuerst zu einem löslichen Trockenreagenz unter wenigstens teilweiser Auflösung des letzteren und transportiert dann zur Meßstelle weiter und läßt den Transport durch zwei verschiedene Kräfte erfolgen, wobei er wenigstens auf einem Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird, der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Transportrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll, größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird.



EI 0 073 513 A1

0073513

Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen und
hierfür geeignetes Mittel

- o1 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung ana-
lytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer
Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines
Parameters im Reaktionsgemisch und ein hierfür geeignetes
05 Mittel.

Die Verwendung von Trockenreagentien auf geeigneten inerten
Trägermaterialien ist ein seit langem bekanntes Hilfsmittel
bei der Durchführung chem. Reaktionen, die zum qualitativen
10 oder quantitativen Nachweis einer zu analysierenden Substanz
herangezogen werden können. Als Beispiele seien genannt:
DE-AS 2332 760, DE-OS 2717 817, EPA 0014 797, DE-OS 2752 352,
DE-OS 2927 345. Diesen Verfahren ist gemeinsam, daß die in
Lösung befindliche Probe auf den Reagenzträger gegeben wird.

- 01 Von seinem Auftragsort diffundiert die Probe dann unter
Einwirkung von Kapillarkräften in den Träger.

Auf dem Weg werden Reagentien ganz oder teilweise aufge-
05 löst, die auf diese Weise gebildete Reagenz-Probeförderung
wandert weiter, bis sie schließlich zu einer Meßzone ge-
langt, wo die Farbintensitätsänderung optisch vermessen
wird. Die Meßzone ist jeweils integraler Bestandteil des
Reagenzträgers.

10

- Wie nun z. B. aus der DE-OS 2927 345 zu entnehmen ist,
werfen Verfahren, bei denen die Diffusionsprozesse unge-
steuert ablaufen und bei denen die Remission von Licht-
strahlen direkt auf dem Reagenzträger, der im allgemeinen
15 aus einer opaken Schicht besteht, gemessen wird, beträcht-
liche Probleme auf. Fasermaterialien zeigen Unregelmäßig-
keiten, die im Mikrobereich zu unterschiedlichen Ausbrei-
tungsgeschwindigkeiten der Flüssigkeiten führen, es ent-
stehen Zonen mit höheren oder niedrigeren Reagenzkonzen-
20 trationen als sie optimal sind. So wird z. B. in der
EPA 0014 797 erwähnt, daß "Lufttaschen" in den Träger-
materialien zu zusätzlichen Schwierigkeiten führen und die
Schlußfolgerung gezogen, daß Flüssigkeitsströme, die durch
Kapillarkräfte erzeugt werden, "kontrolliert" werden müssen.

25

Der zweite wesentliche Nachteil liegt in der Remissions-
messung selbst:

- im Gegensatz zur Durchlicht-Fotometrie gibt es hier keine
lineare Beziehung zwischen der Konzentration einer licht-
30 absorbierenden Substanz und der Extinktion. Man erhält mehr
oder weniger stark gekrümmte Eichkurven, in die die Ober-
flächeneigenschaften stark mit eingehen. Darin ist ein grund-
sätzlicher Nachteil zu sehen, der die Reproduzierbarkeit

- 01 sich bildenden oder abnehmenden Trübungen (turbidimetrische
Verfahren) beruhen, grundsätzlich nicht durchgeführt werden.
Diese stellen aber bei immunologischen Methoden und auch
bei Enzymbestimmungen wie der Lipase-Bestimmung eine weit
05 verbreitete zuverlässige Technik dar.

Ein weiterer Nachteil solcher Analyseelemente ist darin zu
sehen, daß unterschiedliche Reaktionsphasen bei mehrstufiger Re-
aktion auf getrennten Schichten der Analyseelemente nicht
10 gezielt angesteuert werden können. Das heißt, die Startzeit-
punkte von Folgereaktionen hängen von der nicht konstanten
Diffusionsgeschwindigkeit der Lösung ab.

Auch in der schichtenförmigen Anordnung selbst ist ein Nach-
15 teil zu sehen, da die Berührungsflächen von Reagenzien, die
sich in Bezug auf ihre Stabilität ungünstig beeinflussen
können, relativ groß sind. Günstiger wäre es, solche Reagenzien
streng getrennt voneinander in einem Reagenzträger anzuordnen.

- 20 Aus obigem geht hervor, daß es im Sinne der Erzielung von
Analyseenergebnissen mit maximaler Richtigkeit und Reprodu-
zierbarkeit notwendig ist, die genannten Nachteile zu ver-
meiden, da sie dem Anwendungsbereich solcher "Analyseele-
mente", die aus Reagenzträgern aufgebaut sind, relativ enge
25 Grenzen setzen.

Aus der Sicht des Benutzers sind solche Testdurchführungs-
techniken jedoch insofern vorteilhaft, als sie eine sehr
einfache Handhabung erlauben, da keine Reagenzlösungen an-
30 gesetzt werden müssen, da das Pipettieren von Reagenz ent-
fällt, keine Stabilitätsprobleme mit den in Lösung immer
instabileren Reagenzien auftreten usw.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, diese Vor-
35 teile beizubehalten und gleichzeitig die Nachteile zu vermeiden.

- 01 Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Ver-
fahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch
Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens
einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktions-
05 gemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu
einer Meßstelle transportiert wird, welches dadurch ge-
kennzeichnet ist, daß man die Probelösung zuerst zu einem
löslichen Trockenreagenz transportiert unter wenigstens
teilweiser Auflösung des letzteren und dann zur Meßstelle
10 weitertransportiert und der Transport durch zwei ver-
schiedene Kräfte erfolgt, wobei er wenigstens auf einem
Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung
wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird,
der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Trans-
15 portrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/
und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher
Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll,
größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird.
- 20 Das neue Verfahren verbindet die Vorteile der geschilderten
Reagenzträgertechnik mit der Genauigkeit und Fehlerfreiheit
üblicher naßchemischer Verfahren.
Erreicht wird dies dadurch, daß die zu analysierende Probe-
lösung (im allgemeinen mit Wasser verdünnt) in eine Eingabe-
25 stelle gegeben wird, von der aus sie auf dem Weg zu einer
Meßstelle einen oder mehrere Träger von Trockenreagenz
durchströmt, wobei die Reagenzien ganz oder teilweise gelöst
werden. Das Durchströmen geschieht unter strenger Kontrolle
der Fließgeschwindigkeiten und damit der Fließzeiten, indem
30 der treibenden Grenzflächenkraft eine zweite Kraft überlagert
wird, die den Strom beschleunigen, bremsen oder anhalten
kann. Am Ende des Strömungsweges gelangt die Flüssigkeit
dann an eine Meßstelle, die nicht mit dem Reagenzträger

- 01 Als Reagenzien kommen dabei einerseits solche in Frage, die vom Trägermaterial ganz oder teilweise abgelöst werden können, z. B. Puffersubstanzen, Salze, Enzyme oder deren Substrate, andererseits solche, die am Trägermaterial adsorbativ oder kovalent gebunden sind und an denen dann
05 eine "Festphasen-Reaktion" stattfinden kann, beispielsweise Ionenaustauscher, trägergebundene biologisch aktive Substanzen wie Enzyme, Antikörper oder Antigene und ähnliche.
- 10 Für die Messung eines Reaktionssignals eignen sich z. B. außer der schon erwähnten optischen Transmission je nach Ausführungsform der Meßstelle auch Elektrodenpotentiale, elektrische Leitfähigkeit, Fluoreszenzstrahlung usw.
- 15 Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher beschrieben. In dieser stellen dar:
Fig. 1a und 1b Oben- bzw. Seitenansicht eines für die Erfindung geeigneten Einzelementes,
20 Fig. 2 Darstellung des Elementes von Fig. 1a und 1b auf dem Rotor
Fig. 3, 4 und 5 Ansichten eines anderen Analyseelementes zur Durchführung der Erfindung,
25 Fig. 6, 7, 8, 9 und 10 erfindungsgemäß erhaltene Analyseergebnisse in graphischer Darstellung.
- 30 Je nach den überlagerten Kräften (K_2) gibt es im wesentlichen zwei Ausführungsformen der Erfindung, wobei die treibenden Kräfte (K_1) jeweils Grenzflächen- bzw. Kapillarkräfte sind.
- Bei der ersten Ausführungsform ist K_2 eine Zentrifugalkraft.
- 35 Bei diesem Analysensystem werden austauschbare Einzele-

- 01 Polyurethan u. ä. sowie Reagenzträgerfeldern, die aus einem
saugfähigen Trägermaterial, das mit dem Reagenz imprä-
niert ist, oder anderen kleinen reagenzgefüllten Hohlräumen
(z. B. einer Oberflächenstruktur im Plastikkörper), die in
05 den Plastikkörper eingelegt sind, und einer Verschießfolie
bestehen, so auf einen Rotor einer Zentrifuge gesteckt, daß
die flüssigkeitsbewegende Kapillarkraft von der Zentrifugal-
kraft gesteuert werden kann. Hierzu ist notwendig, daß ver-
schiedene Drehzahlen und damit Zentrifugalkräfte eingestellt
10 werden können.

Der Analysenablauf bei dieser Ausführungsform der Erfindung
wird anhand der Figuren 1a und 1b der beigefügten Zeichnung
näher beschrieben. Fig. 1a zeigt ein für die Erfindung ge-
15 eignetes Einsatzelement in der Aufsicht, Fig. 1b in der
Seitenansicht im Schnitt.

Fig. 2 stellt schematisch dar, wie das Einsatzelement von Fig. 1 auf
einem geeigneten Zentrifugenrotor, wie er z. B. in der
20 DE-OS 3044372 beschrieben ist, durch hier nicht gezeigte
Befestigungsmittel aufgebracht ist.

Wie in Fig. 1a gezeigt, ist in einem Plastikformkörper eine
Probenauftragskammer (31) vorgesehen, die mit verschiedenen
25 Reagenzfeldern I bis VII (32) in Verbindung steht. Jedes
Reagenzfeld besteht aus einem mit einem bestimmten Reagenz
imprägnierten Stück saugfähigen Trägers, wie z. B. Papier
oder Vlies. (33) und (33a) sind Mischventile I und II, (34)
bezeichnet die Meßstelle (Küvette). Fig. 1b zeigt das Ein-
30 satzelement von Fig. 1a in Seitenansicht. (35) bezeichnet
den Plastikgrundkörper, (36) die Verschießfolie durch die
Probenauftragskammer, Reagenzfeldermischventile und Meß-
stelle abgedeckt sind.

- 01 Die Probe wird in die Probenauftragskammer (31) gegeben. Dann
wird eine bestimmte Drehzahl U_1 eingestellt, die geeignet
ist, die Probe an das Reagenzfeld I (32) heranzuführen. So-
bald der Kontakt hergestellt ist, saugt die Kapillarkraft
05 die Lösung auf, d. h. die Lösung wird über das Reagenzfeld (32)
transportiert. Ist die Zentrifugalkraft Z_1 kleiner als die
Kapillarkraft K_1 , bleibt die Lösung, sofern das Aufnahme-
volumen des Feldes größer ist als das Volumen der aufgegebe-
nen Probe, in dem Feld (32). Mit der Bedingung $Z_1 < K_1$ ist
10 also die Verweilzeit der Lösung in R I genau festzulegen.
Vergrößert man nun die Zentrifugalkraft auf Z_2 , so daß
 $Z_2 > K_1$ gilt, verläßt die um das auf R I befindliche Reagenz
angereicherte Lösung dieses Feld und tritt mit dem Reagenz-
feld R II in Kontakt. Hier wiederholt sich der Vorgang. Die
15 Lösung wird über R II verteilt, d. h. weitertransportiert.
In Analogie gelten die oben beschriebenen Bedingungen.

- Der Vorgang läßt sich beliebig oft wiederholen, wobei im
hier skizzierten Fall Reagenzfelder I bis IV durchlaufen
20 werden. Natürlich können die Einsatzelemente anders ge-
staltet sein und auch mehr oder weniger Reagenzfelder auf-
weisen. Die Kräfte K_n und Z_n sind praktisch frei wählbar,
was vor allem für letztere durch die stufenlose Einstellung
von Z technisch sehr einfach realisiert werden kann.
25 Die Durchführung von Analysenverfahren gewinnt dadurch an
Vorteilen, daß man die dazu benötigte Zeit so kurz wie
möglich hält. Deshalb sollte auch die Verweilzeit der
Lösung auf den Reagenzfeldern so kurz wie möglich sein.
Es ist möglich, die Zentrifugalkraft Z so groß zu wählen,
30 daß die Lösung von den Kapillarkräften nur gebremst wird,
d. h. die Lösung kommt nicht zum Stehen, sondern wandert
mit von der Kraft $(Z_n - K_n)$ hervorgerufener Geschwindig-
keit durch die entsprechenden Reagenzfelder. Findet dieser

01 es leicht möglich, daß sich an der Lösungsfront höhere
Reagenzkonzentrationen einstellen, d. h. in Richtung Zentri-
fugalkraft baut sich über das Lösungsvolumen ein Konzen-
trationsanstieg auf.

05

Zur Einhaltung definierter Reaktionsbedingungen gehört es
jedoch, einheitliche Konzentrationsverhältnisse - wenn
nötig - einzustellen. Um derartige Inhomogenitäten zu be-
seitigen, wird erfindungsgemäß ein sogenanntes Misch-
10 ventil (33) vorgesehen. Das Mischventil (33) weist eine in
Richtung der Zentrifugalkraft geschlossene Begrenzungs-
wand auf. Am Boden ist eine schräg nach unten entgegen der
Strömungsrichtung von Probeauftragskammer zu Meßstelle ange-
ordnete grenzflächenaktive Kammer, z. B. Kapillare angeord-
15 net, welche an ihrem unteren Ende umbiegt und zum Reagenz-
feld V weiterführt. Solange die Zentrifugalkraft Z_3 größer
ist als die Kapillarkraft in der Bodenkapillare K_3 , wird die
Flüssigkeit an der Begrenzungswand festgehalten. Senkt man
 Z_3 unter den Wert von K_3 , so saugt die Kapillare die Flüs-
20 sigkeit selbständig aus dem Mischraum (33) in die zugehörige
Kapillare ab, wobei vorher bestehende Gradienten beseitigt
werden und die Kapillarkraft transportiert die Flüssigkeit
zum Reagenzfeld V. Allgemein ausgedrückt wirkt daher hier die
Kapillarkraft in der Kapillare des Mischventils (33) immer
25 als Transportkraft, wenn $Z < K$ ist.

Die Standzeit im Mischventil (33) ist wiederum frei wählbar
durch die Einstellung der Bedingung $Z_M > K_M$. Die Bedingung
für den Transport ist also genau umgekehrt zu den oben be-
30 schriebenen Bedingungen.

Die weiteren Schritte über die Reagenzfelder V bis VII und
über das Mischventil II (33a) brauchen nicht erneut beschrie-
ben werden, sie ergeben sich aus Analogiebetrachtungen zu

01 in die Küvette (34) zu befördern. In bekannten Ausführungs-
formen von Zentrifugalanalysen ist das Mischen ein auf-
wendiger Vorgang, der z. B. durch starkes Beschleunigen und
05 mit Luft bewirkt wird. Dies wird erfindungsgemäß mit tech-
nisch einfachen Mitteln vermieden.

Bei der zweiten Ausführungsform der Erfindung ist K_2 eine
Druckkraft.

10

In den Fig. 3, 4 und 5 der Zeichnung werden für diese Aus-
führungsform geeignete Mittel in Form von wegwerfbaren
Analyselementen dargestellt.

15 In Fig. 3 ist ein derartiges Element in Aufsicht, in Fig. 4
in der Seitenansicht schematisch dargestellt. Der aus einem
geeigneten Material, wie z. B. Plastik bestehende Formkörper
(8) weist Reagenzträgerfelder (5, 6, 7) auf, die in den
Plastikkörper eingelegt sind. Durch eine elastische Ver-
20 schließfolie (11) sind diese Reagenzträgerfelder abgedeckt.
Eine Probenauftragskammer (9) enthält ein saugfähiges iner-
tes zusammenpreßbares Material, das beispielsweise in ent-
lastetem Zustand 15 µl Flüssigkeit aufnehmen kann und im zu-
sammengepreßten Zustand beispielsweise 2 µl Flüssigkeit zu-
25 rückhält. Eine Ausbuchtung im Körper (8) dient als Meßstelle
bzw. Küvette (21). Der Körper (8) weist außerdem eine Über-
laufkammer (10) und eine Entlüftungsbohrung (12) auf.

Ventilschlitze (1, 2, 3, 4) dienen zur Aufnahme von Ventil-
30 stempeln, mit denen die einzelnen Reagenzträgerfelder von-
einander getrennt werden können. Außerdem sind Druckstempel
(13, 14, 15, 16) vorgesehen, deren Grundfläche genau der
Fläche der jeweiligen Reagenzträgerfläche entspricht und
die dazu dienen, gefüllte Reagenzfelder zusammenzudrücken
35 (Fig. 5)

- 01 Der Verfahrensablauf bei dieser Ausführungsform der Erfindung ist folgendermaßen:

05 Die Probe wird in die Auftragskammer (9) gebracht, indem die Folie (11) mit einer Nadel durchstochen wird. Es wird eine solche Menge injiziert, daß sich das inerte, saugfähige Vlies in der Kammer (9) vollständig füllt, aber keine Lösung abgibt. Anschließend wird z. B. durch eine geeignete Steuerungsvorrichtung, der Stempel (13) auf das Feld (9) gedrückt, 10 so daß die Flüssigkeit dieses Feld verlassen muß und mittels der Kapillarkraft in das Feld (5) transportiert wird. Über die Kohäsion der Flüssigkeit wird diese praktisch vollständig nach (5) überführt. Anschließend wird der Ventilstempel (17) z. B. ebenfalls über einen geeigneten Mechanismus gesteuert, 15 heruntergedrückt, so daß (5) von der Auftragskammer (9) abgetrennt ist. Die Folie (11) paßt sich jeweils den Konturen an und dient als Dichtmembran. Die Probelösung kann eine frei wählbare Zeit lang im Feld (5) stehen gelassen werden. In der Regel löst sich allerdings das im Feld (5) befindliche 20 Trockenreagenz innerhalb weniger Sekunden. Im nächsten Schritt wird der Stempel (14) auf das Feld (5) gedrückt, so daß die Flüssigkeit dieses Feld verlassen muß und über die kapillare Ansaugwirkung des Feldes (6) in dieses hineintransportiert wird. Danach wird der Ventilstempel (18) 25 heruntergedrückt, so daß der Kontakt zu Feld (5) unterbrochen ist. Wiederum kann die Zeit zur Ab- oder Auflösung des Reagenz in Feld (6) frei gewählt werden (wobei es sich wiederum im allgemeinen um Sekunden dauernde Vorgänge handelt).

- 30 Sollte sich bei dem Flüssigkeitstransport durch Kapillarkräfte und bei dem Einströmen in das Reagenzfeld ein Konzentrationsgradient aufbauen, kann dieser dadurch beseitigt werden, daß man vor dem Warten

und Andrücken des Stempels (15), wird die Flüssigkeit nach Feld (5) zurücktransportiert. Durch Anheben von Stempel (15) und Andrücken von Stempel (14) wird die Flüssigkeit wieder nach Feld (6) zurückbefördert. Gegebenenfalls kann diese Vor-Rück-Bewegung mehrere Male wiederholt werden. Zum Schluß wird dann wieder der Zustand hergestellt: Stempel (14) ange-drückt, Ventilstempel (18) angedrückt.

Der Weitertransport der Flüssigkeit von Feld (6) nach Feld (7) erfolgt nach gegebenenfalls Abheben von Ventilstempel (19) in analoger Weise durch Andrücken von Ventilstempel (18) und Andrücken von Stempel (15). Gegebenenfalls kann der Mischvorgang zwischen Feld (6) und Feld (7) in Analogie zur beschriebenen Weise unter Benutzung von Ventilstempel (20) wiederholt werden.

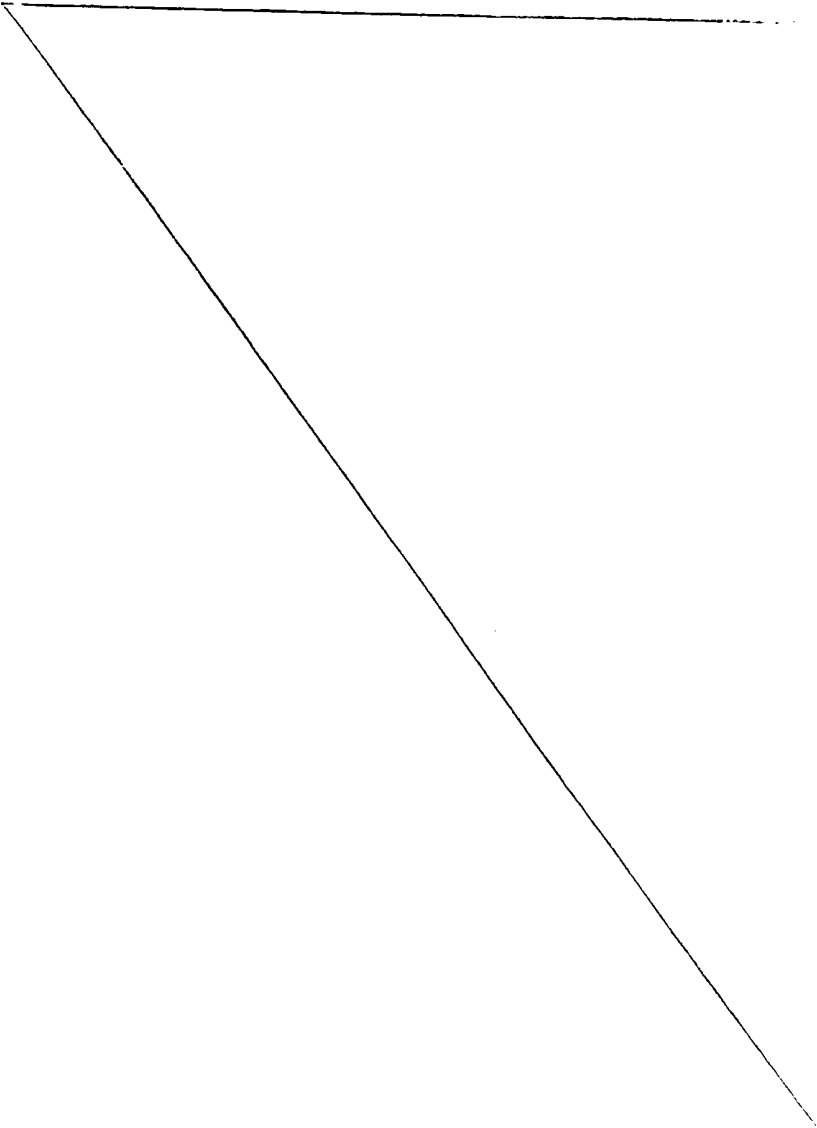
Nach Auflösen des Reagenz in Feld (7) wird die so ent-standene Lösung dann durch Andrücken von Ventilstempel (19) und Andrücken von Stempel (15) in die Küvette (21) gedrückt.

Danach wird in geeigneter Weise in einem üblichen Verfahren die Extinktionsänderung während einer genügend langen Zeit gemessen. Aus dieser Signaländerung kann ebenfalls mit üblichen Methoden die Konzentration der zu analysierenden Substanz berechnet werden.

Die für die Durchführung der für das Verfahren erforderliche Änderung der 1. bzw. 2. Kraft zur Verfügung stehenden Maß-nahmen sind für die Zentrifugalkraft in erster Linie in Drehzahländerungen, für die Druckkraft in Bewegung von Druck-stempeln zu sehen. Die Grenzflächenkraft kann außer durch die Oberflächengestaltung auch durch Einsatz oberflächenaktiver Mittel geregelt bzw. verändert werden. Als oberflächenaktive

0073513

Mittel werden die Polyoxyäthylenderivate bevorzugt,
jedoch können auch andere nichtionische Detergentien
sowie anionische Detergentien, z.B. Gallensäurederivate,
oder kationische Detergentien oder Gemische davon ver-
wendet werden.



Beispiele für erfindungsgemäß durchführbare Analysen sind die in der DE-OS P 30 44 385 beschriebenen. Insbesondere eignet sich das Verfahren zur Bestimmung von Glucose, Bilirubin, Creatinin, Albumin, Eiweiß, Eisen, Hemoglobin, Harnstoff, Harnsäure, Triglyceriden, Cholesterin, Chlorid, Kalzium, Phosphat, γ -GT, alkalischer Phosphate, GOT, GPT, Lactatdehydrogenase, Lipase, Amylase, Creatinkinase, Schilddrüsenhormonen, saure Phosphatase, Drogen, Krebsindikatoren und Gerinnungsfaktoren, wobei jeweils für diese Bestimmungen an sich bekannte Reagenzien eingesetzt werden können.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

B e i s p i e l 1

Glucosebestimmung unter Verwendung des Einsetzelements gemäß Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, im beschriebenen Einsetzelement positioniert:

III	Natriumphosphatpuffer	630 μ g
	2,4-Dichlorphenolsulfonsäure	466 μ g
	Tween 20 (Sorbinacrogollaurat)	50 nl
	Mannit	1 mg
IV	4-Aminoantipyrin	24 μ g
VII	GOD (E.C. 1.1.3.4)	2200 mU
	POD (E.C. 1.11.1.7)	400 mU

Humanserumproben wurden 1 : 200 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 μ l in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

01 Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

- | | | | | |
|----|----|---------|----------|--------------------------------------|
| | 1. | 10 sec | 180 Upm | Anfeuchten der ersten Vliese |
| | 2. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 1. Mischventil (3) |
| 05 | 3. | 15 sec | 0 Upm | Überführung nach V |
| | 4. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 2. Mischventil (3a) |
| | 5. | 15 sec | 0 Upm | Entleeren des 2. Mischventils (3a) |
| | 6. | 10 sec | 150 Upm | Überführen in die Küvette (4) |
| | 7. | 5 sec | 1500 Upm | Austreiben von Luftblasen |
| 10 | 8. | 225 sec | 360 Upm | Messung bei 500 nm |

Die Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit wurde gemessen und nach einem der üblichen "Fixed-time-kinetischen Verfahren" ausgewertet. Die unbekannten Konzentrationen an Glucose in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist sehr gut, wie aus Fig. 6 zu erkennen ist, welche die Ergebnisse der Vergleichsmethode auf der Abscisse, der erfindungsgemäßen Methode auf der Ordinate zeigt.

Auf der Ordinate sind auch in den folgenden Beispielen die Werte mit der erfindungsgemäßen Methode aufgetragen (Symbol ZF).

Beispiel 2

30 Alkalische Phosphatase wurde auf dem Einsatzelement gemäß Fig. 1 und 2 bestimmt.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich

01	II	Natriumkarbonatpuffer	1200 µg
		Magnesiumaspartat	16 µg
	III	Natriumkarbonatpuffer	1200 µg
05		Magnesiumaspartat	16 µg
	VI	Tris-p-Nitrophenylphosphat	313 µg
		Tris	31 µg

10 Eine Humanserumprobe wurde 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 µl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 37 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

- | | | | | |
|----|----|---------|----------|--------------------------------------|
| 15 | 1. | 10 sec | 180 Upm | Anfeuchten der ersten Vliese |
| | 2. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 1. Mischventil (3) |
| | 3. | 15 sec | 0 Upm | Überführung nach V |
| | 4. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 2. Mischventil (3a) |
| | 5. | 15 sec | 0 Upm | Entleeren des 2. Mischventils (3a) |
| 20 | 6. | 10 sec | 150 Upm | Überführen in die Küvette (4) |
| | 7. | 5 sec | 1500 Upm | Austreiben von Luftblasen |
| | 8. | 225 sec | 360 Upm | Messung bei 410 nm |

25 Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren, bei denen die Steigung der Geraden ein Maß für die Aktivität des zu bestimmenden Enzyms ist, ausgewertet. Die unbekannten Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die

30 Korrelation mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist gut, wie aus Fig. 7 zu erkennen ist.

B e i s p i e l 3

01 Bilirubin-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagentien aufgebracht und wie aus Fig. 1
05 ersichtlich, positioniert:

II 2,5-Dichlorphenyldiazonium-naphtolsulfonat 68 µg

10 III Cetylpyridiniumchlorid 1600 µg
Weinsäure 2400 µg

V Nicht imprägniertes Filterpapier

15 Serumproben wurden 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden je 60 µl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

- | | | | | |
|----|----|---------|----------|--------------------------------------|
| 20 | 1. | 10 sec | 180 Upm | Anfeuchten der ersten Vliese |
| | 2. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 1. Mischventil (3) |
| | 3. | 15 sec | 0 Upm | Überführung nach V |
| | 4. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 2. Mischventil (3a) |
| | 5. | 15 sec | 0 Upm | Entleeren des 2. Mischventils (3a) |
| 25 | 6. | 10 sec | 150 Upm | Überführen in die Küvette (4) |
| | 7. | 5 sec | 1500 Upm | Austreiben von Luftblasen |
| | 8. | 225 sec | 360 Upm | Messung bei 550 nm |

30 Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen "Endpunkt-Verfahren" ausgewertet; die unbekannten Konzentrationen an Bilirubin in der Probe wurden nach Eichung bestimmt.

Die Messung ist sehr gut, wie Fig. 6 zeigt.

B e i s p i e l 4

- 01 Creatinkinase-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1
und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm
05 wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1
ersichtlich, positioniert:

	IV	Imidazol	424 µg
		Glucose	240 µg
10		Magnesiumchlorid · 6H ₂ O	128 µg
		EDTA-Natrium-Salz	47 µg
		N-Acetylcystein	205 µg
		Adenosinmonophosphat-Natrium-Salz	157 µg
		Adenosindiphosphat	54 µg
15		Diadenosinpentaphosphat-Lithium-Salz	0,6 µg
		NADP-Natrium-Salz	110 µg
V		Hexokinase (E.C. 2.7.1.1.)	218 mU
		Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49)	123 mU
		Creatinphosphat-Natrium-Salz	615 µg
20			

Eine Humanserumprobe wurde 1 : 25 mit bidest. Wasser ver-
dünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 µl in die
Probenauftragskammer (1) gegeben.

- 25 Es wurde bei 37 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

30	1.	10 sec	180 Upm	Anfeuchten der ersten Vliese
	2.	10 sec	1500 Upm	Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
	3.	15 sec	0 Upm	Überführung nach V
	4.	10 sec	1500 Upm	Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)
	5.	15 sec	0 Upm	Entleeren des 2. Mischventils (3a)
	6.	10 sec	150 Upm	Überführen in die Küvette (4)
	7.	5 sec	1500 Upm	Austreiben von Luftblasen
	8.	225 sec	360 Upm	Messung bei 340 nm

01 Die aufgezählten Abhängigkeiten der Extinktionen von
der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren für
kinetische Messungen ausgewertet, die unbekannten Akti-
05 vitäten an Creatinkinase in der Probe wurden nach Eichung
des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Überein-
stimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekann-
ten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist sehr gut, wie
Fig. 9 zeigt.

10

B e i s p i e l 5

IgG-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1 und 2.

15 Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm
wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1
ersichtlich, positioniert (in diesem Fall wurden zwei ver-
schiedene Reagenzträgerpapiere in die gleiche Kammer gege-
ben):

20

V	Natriumhydrogenphosphat $\cdot 2H_2O$	620 μg
	Kaliumdihydrogenphosphat	107 μg
	Polyäthylenglycol 6000	1570 μg

25

V	Antikörper gegen IgG (Titer = 16 mg/ml)	258 μg
---	---	-------------

Eine Humanserumprobe wurde 1 : 200 mit bidest. Wasser ver-
dünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 μl in die
Probenauftragskammer (1) gegeben.

30

Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

- | | | | |
|----|--------|----------|-------------------------------------|
| 1. | 10 sec | 180 Upm | Anfeuchten der ersten Vliese |
| 2. | 10 sec | 1500 Upm | Ausschleudern in 1. Mischventil (3) |
| 35 | 3. | 15 sec | 0 Upm Überführen nach V |

- 01 5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 340 nm

05

Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren zur Auswertung von kinetischen Trübungstesten ausgewertet, die unbekannten Konzentrationen an IgG in der Probe werden nach Eichung des Verfahrens mit 3 Standards unterschiedlicher Konzentration und Erstellung einer Eichkurve bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine Adaptation auf dem Analysenautomaten "ABA 100" der Firma ABBOTT zugrunde liegt, ist sehr gut, wie Fig. 10 zeigt.

15

B e i s p i e l 6

Glucosebestimmung mit dem Analyseelement gemäß Fig. 3.

20

Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie folgt hergestellt: 10 µl der Reagenzlösungen, die ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die verschiedenen Papiere des Beispiels in Beispiel 1, werden auf ein Papier der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden vollständig aufgesaugt; anschließend wird das Lösungsmittel Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

30 Die drei verschiedenen Papiere werden in der gleichen Reihenfolge wie in Beispiel 1 auf die drei Positionen des Analyselements von Fig. 3 gelegt.

Die Probe wird 1 : 200 mit biest. Wasser verdünnt.

01 Weise auf den ersten Reagenzträger (1) gebracht. Verweil-
zeit: 10 sec. Anschließend wird die Lösung aus (5) nach
(6) in ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise ge-
bracht. Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wird die
05 Lösung auf den Reagenzträger 3 (7) gebracht. Verweil-
zeit: 5 sec. Von dort wird die Lösung durch langsames Ab-
senken des Stempels (16) in die Küvette (21) gebracht. In
ihr wird in bekannter Weise die Extinktion bei 500 nm in
Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Aus dem Verlauf die-
10 ser Kurve kann mit dem bekannten "Fixed-time-kinetischen"
Verfahren nach Eichung mit einem Standard die Glucosekon-
zentration in unbekannten Proben bestimmt werden.

15 Es wurden wäßrige Lösungen mit den Konzentrationen 50,
100, 150, 200, 300 und 400 mg/dl (durch Einwaage einge-
stellt) untersucht. Die Wiederfindung lag zwischen 98
und 102 %.

20 B e i s p i e l 7

Alkalische Phosphatase mit dem Element gemäß Fig. 3.

25 Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie
folgt hergestellt: 10 µl der Reagenzlösungen, die genau
ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die ver-
schiedenen Papiere des Beispiels 2, werden auf ein Papier
der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden voll-
ständig aufgesaugt; anschließend wird das Lösungsmittel
30 Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

Die beiden Papiere werden in der gleichen Reihenfolge wie
in Beispiel 2 auf die ersten beiden Positionen des Ana-
lysenelements von Fig. 3 gelegt. Auf die dritte Position
35 wird ein Papier gelegt, das mit Wasser befeuchtet ist.

- 01 Die Probe wird mit bidist. Wasser verdünnt. 5 μ l
dieser verdünnten Lösung werden in die Auftragskammer (5)
gegeben. Dann wird die Lösung in der geschilderten Weise
auf den ersten Reagenzträger (5) gebracht. Verweilzeit:
05 10 sec. Anschließend wird die Lösung aus (5) nach (6) in
ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise gebracht.
Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wird die Lösung
auf das Leervlies (7) gebracht. Verweilzeit: 5 sec. Von
dort wird die Lösung durch langsames Absenken des Stem-
10 pels (16) in die Küvette (21) gebracht. In ihr wird die
Extinktion bei 410 nm in Abhängigkeit von der Zeit ver-
folgt. Aus dem Verlauf der aufgezeichneten Geraden kann
mit bekannten kinetischen Bestimmungsverfahren nach Eichung
mit einem Standard die Aktivität der alkalischen Phospha-
15 tase in unbekannten Proben bestimmt werden.

Es wurden verschiedene Kontrollseren, die Aktivitäten
zwischen 30 und 600 U/l enthielten, untersucht. Die Wieder-
findung lag zwischen 90 und 110 %.

20

B e i s p i e l 8

Creatinkinasebestimmung mit dem Element gemäß Fig. 3.

25

- Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie
folgt hergestellt: 10 μ l der Reagenzlösungen, die genau
ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die ver-
schiedensten Papiere des Beispiels 4, wurden auf ein Papier
30 der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden voll-
ständig aufgesaugt; anschließend wurde das Lösungsmittel
Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

- Die beiden Papiere wurden in der gleichen Reihenfolge wie
35 in Beispiel 1 auf dem Element aufgetragen.

Abbild. 8a und 8b.

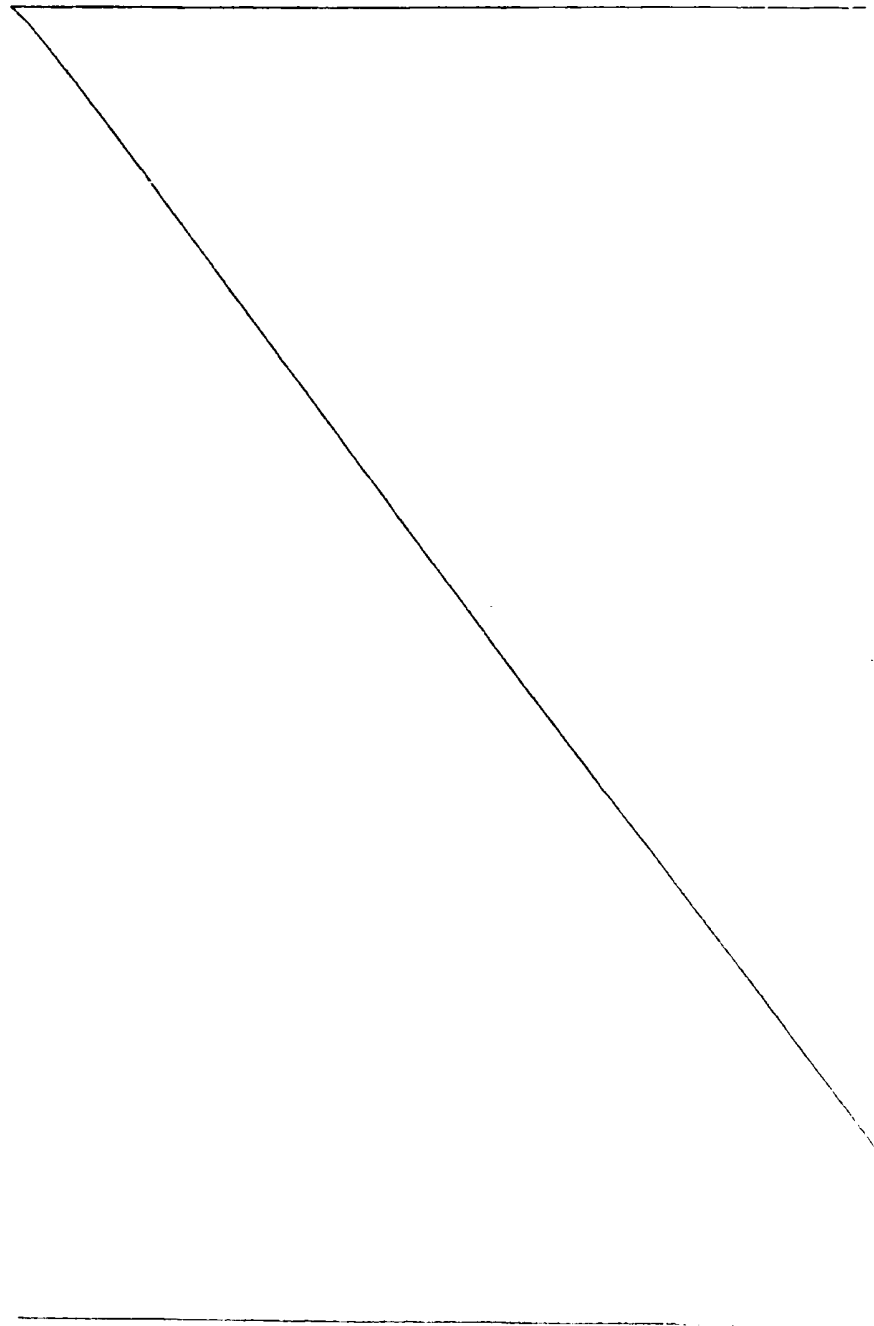
- 01 Die Probe wurde 1 : 25 mit bidest. Wasser verdünnt. 15 μ l
dieser verdünnten Lösung wurden in die Auftragskammer (9)
gegeben. Dann wird die Lösung in der geschilderten Weise
auf den ersten Reagenzträger (5) gebracht. Verweilzeit:
05 10 sec. Anschließend wurde die Lösung aus (5) nach (6) in
ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise gebracht.
Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wurde die Lösung
auf das Feld (7) bewegt. Verweilzeit: 5 sec. Von dort
wird die Lösung durch langsames Absenken des Stempels (16)
10 in die Küvette (21) gebracht. In ihr wird in bekannter
Weise die Extinktion bei 340 nm in Abhängigkeit von der
Zeit verfolgt. Nach einer gekrümmten Anfangsphase erhielt
man einen linearen Verlauf dieser Funktion. Aus diesem An-
teil wird mit Hilfe von bekannten Auswerteverfahren für
15 kinetische Methoden nach Eichung mit einem Standard die
Aktivität an Creatinkinase in einer unbekannten Probe be-
stimmt.

- Es wurden verschiedene Humanserumproben mit aufgereinigtem
20 Enzym in der Weise aufgestockt, daß man Aktivitäten von
5 bis 800 U/l erhielt. Vergleichswerte wurden durch eine
manuelle Messung gewonnen. Die Wiederfindungen gegenüber
diesen manuellen Werten lagen zwischen 92 und 110 %.

an s p r ü c h e

1. Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu einer Meßstelle transportiert wird, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Probelösung zuerst zu einem löslichen Trockenreagenz transportiert unter wenigstens teilweiser Auflösung des letzteren und dann zur Meßstelle weitertransportiert und der Transport durch zwei verschiedene Kräfte erfolgt, wobei er wenigstens auf einem Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird, der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Transportrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll, größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die erste physikalische Kraft in Richtung oder/und entgegen der Richtung der zweiten physikalischen Kraft einwirken läßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die erste physikalische Kraft durch die Oberflächengestaltung oder/und oberflächenaktive Mittel regelt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Wert der zweiten physikalischen Kraft
mehrmals höher und niedriger als den Wert der
ersten physikalischen Kraft einstellt.



5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man während der Inkubation des Reagenz-Probeförderungsgemisches den Wert der zweiten physikalischen Kraft über den Wert der ersten physikalischen Kraft einstellt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die zweite physikalische Kraft durch Änderung der Drehzahl eines Zentrifugenrotors erhöht oder erniedrigt.
7. Rotoreinsatzelement zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 6 mit einer Zentrifugalkraft als zweiter Kraft, gekennzeichnet durch einen Formkörper (35) mit einer Probenauftragskammer (31), die mit einer Mehrzahl von Reagenzfeldern (32) in Verbindung steht, die jeweils ein mit einem bestimmten Reagenz imprägniertes saugfähiges Trägermaterial enthalten, wenigstens einer Mischventilkammer (33, 33a), einer Meßkammer (34) und Mittel (36) zum Verschließen der Kammern und Felder.
8. Analyseelement zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 5 mit einer Druckkraft als zweiter Kraft, gekennzeichnet durch einen Formkörper (8) mit einer Probenauftragskammer (9), in der sich ein saugfähiges, inertes zusammenpreßbares Material befindet, einer Mehrzahl von Reagenzträgerfeldern (5, 6, 7), die jeweils ein mit einem bestimmten Reagenz imprägniertes saugfähiges zusammenpreßbares Trägermaterial enthalten, einer Meßkammer (21), einer Überlaufkammer (10) und einer Entlüftungsbohrung (12), sowie mit zwischen den einzelnen Reagenzträgerfeldern (5, 6, 7) sowie der Überlaufkammer

- 01 weglich angeordneten Ventilstempeln sowie weiter einer
Mehrzahl von Druckstempeln (13, 14, 15, 16) die so an-
geordnet sind, daß sie unabhängig voneinander auf die
05 Probenauftragskammer (9) und die Reagenzträgerfelder
(5, 6, 7) eine bestimmte Druckkraft auszuüben vermögen.

10

FIG. 1a

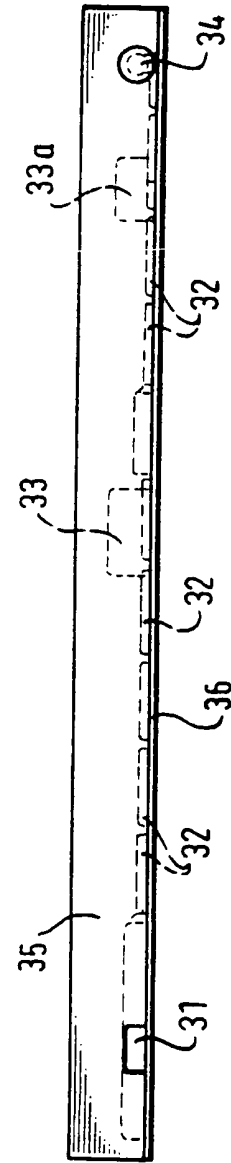
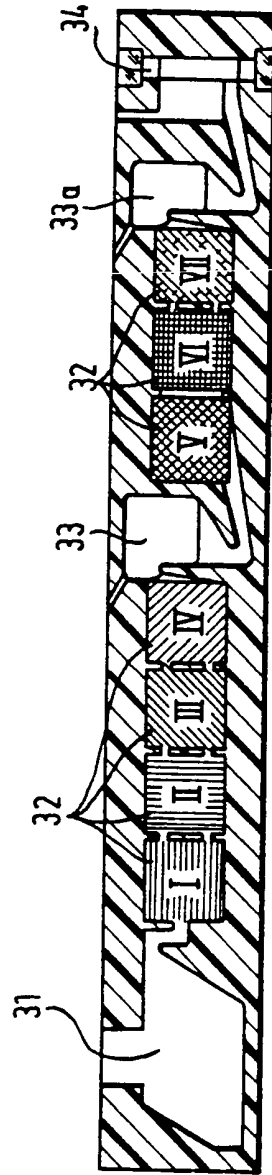


FIG. 1b

FIG. 2

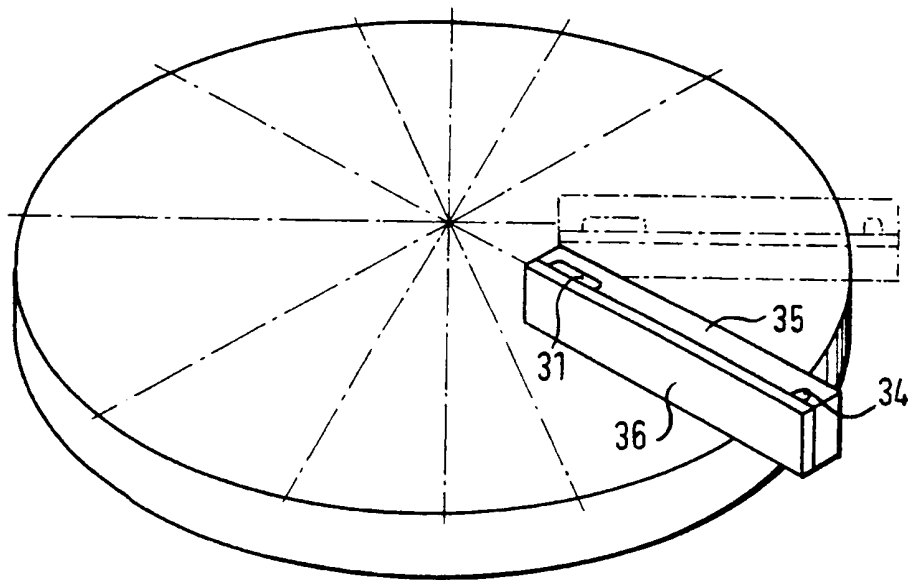


FIG. 3

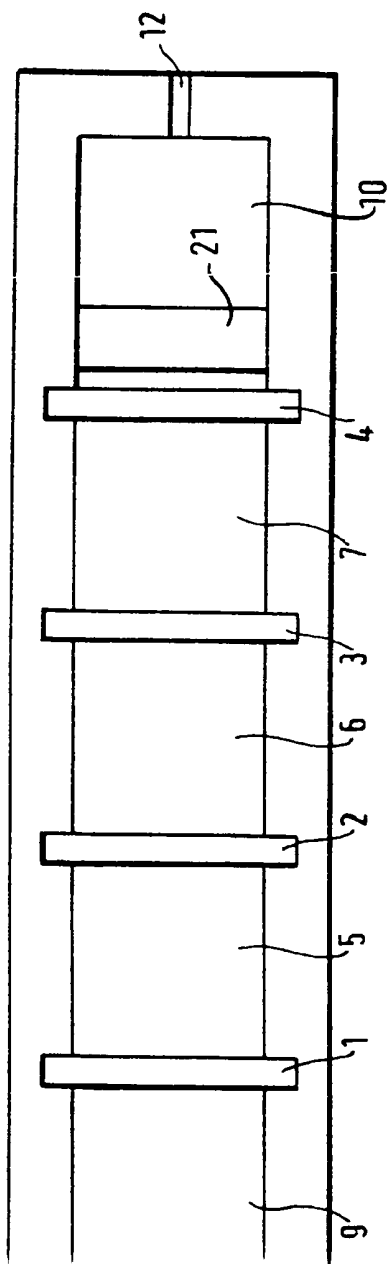


FIG. 4

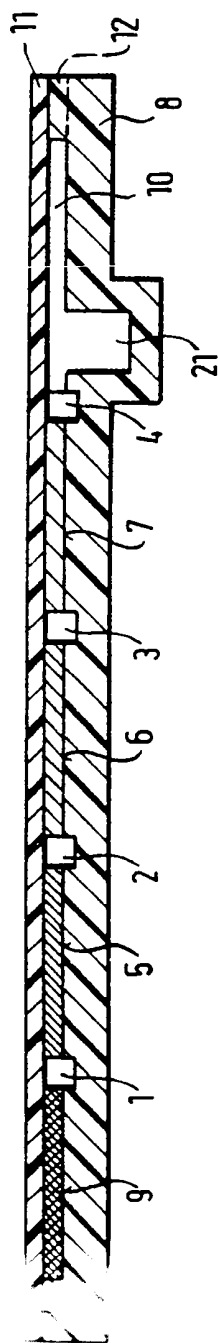
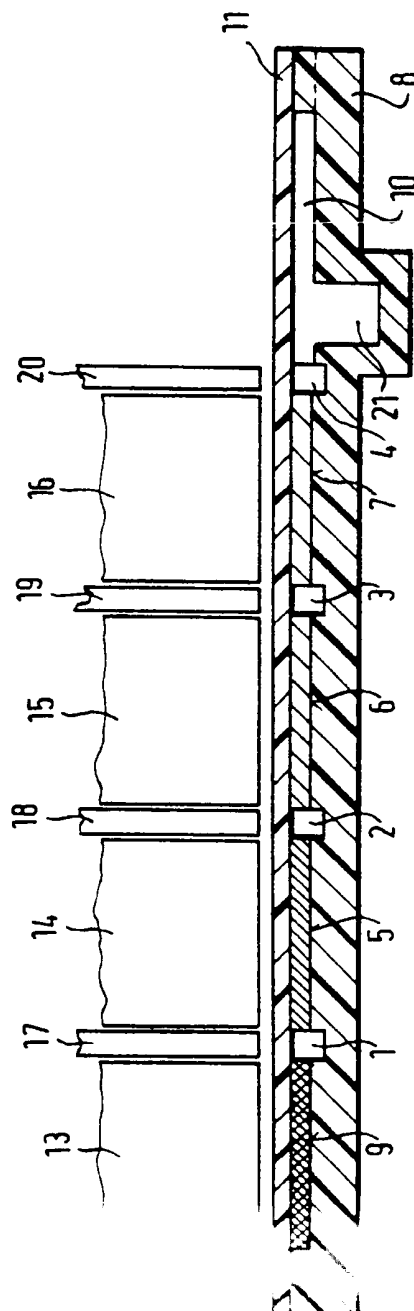
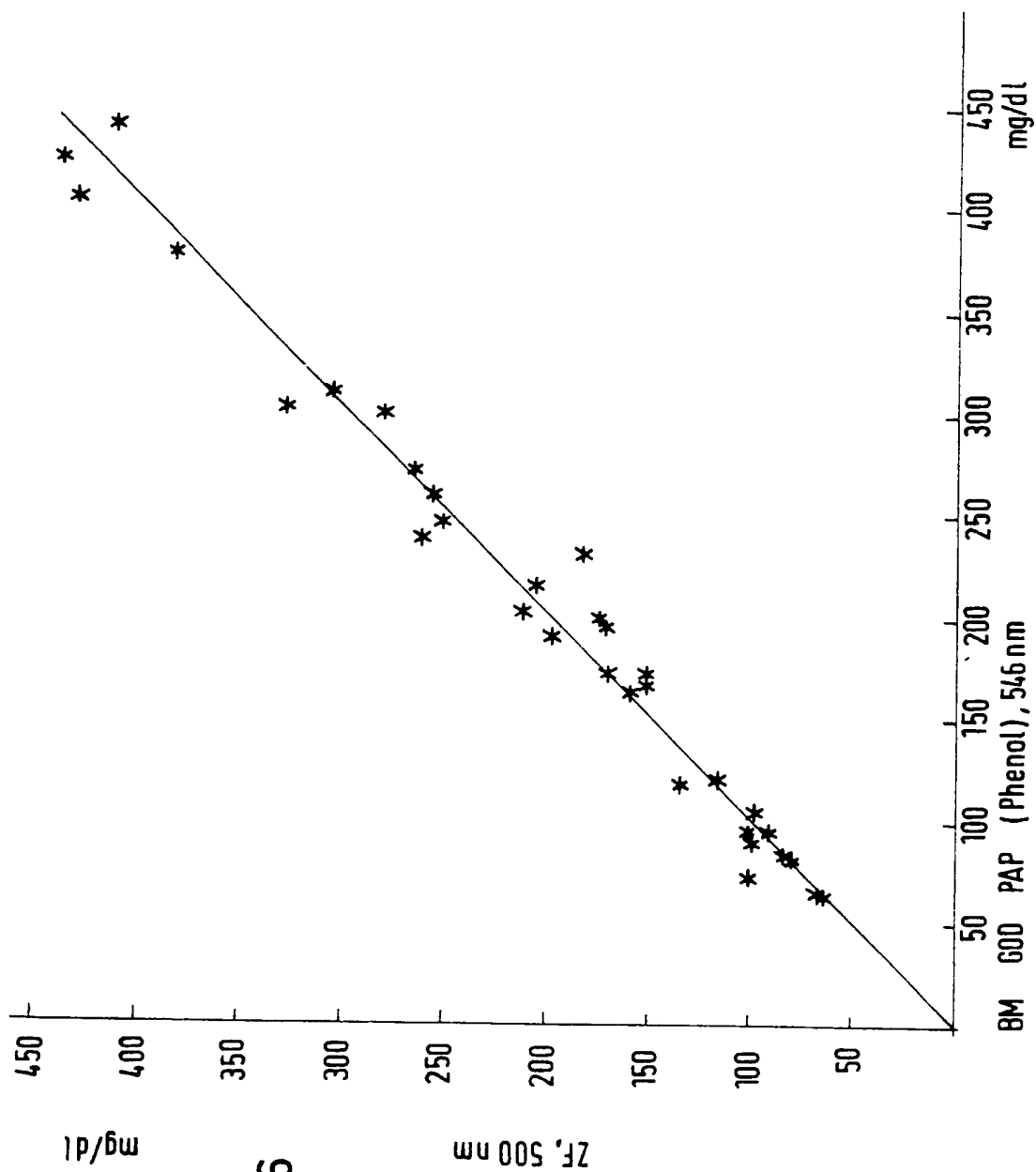
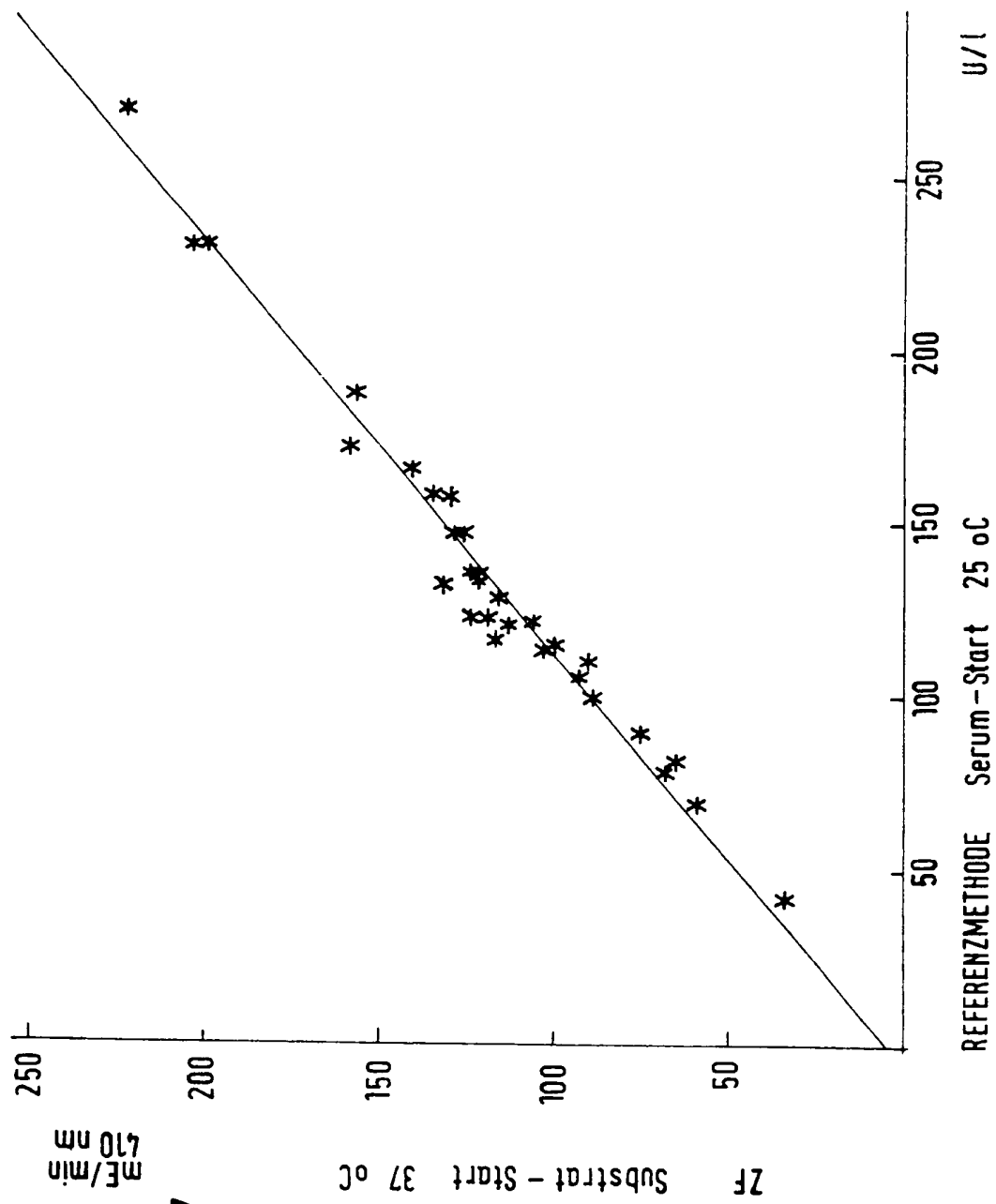
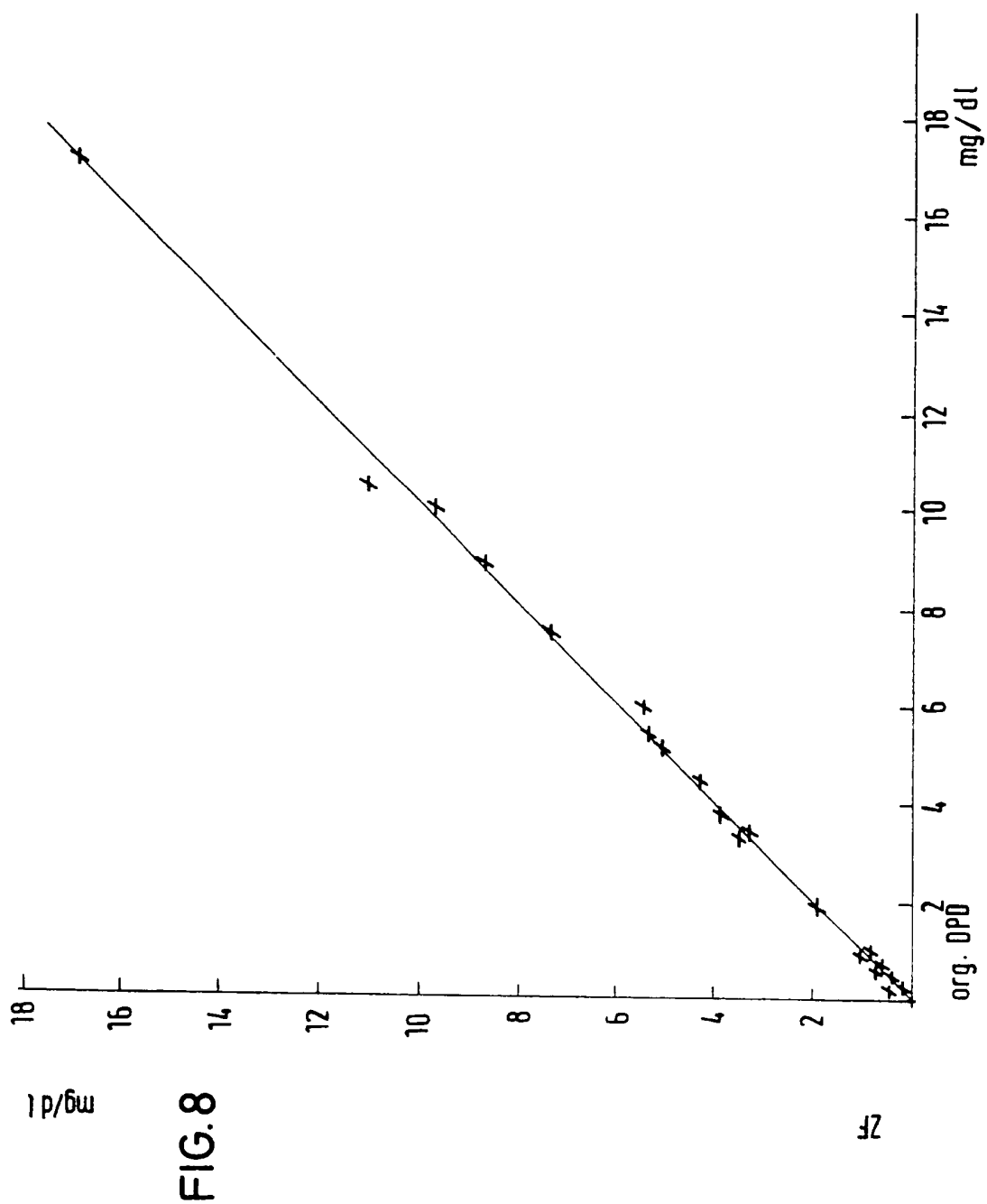


FIG. 5









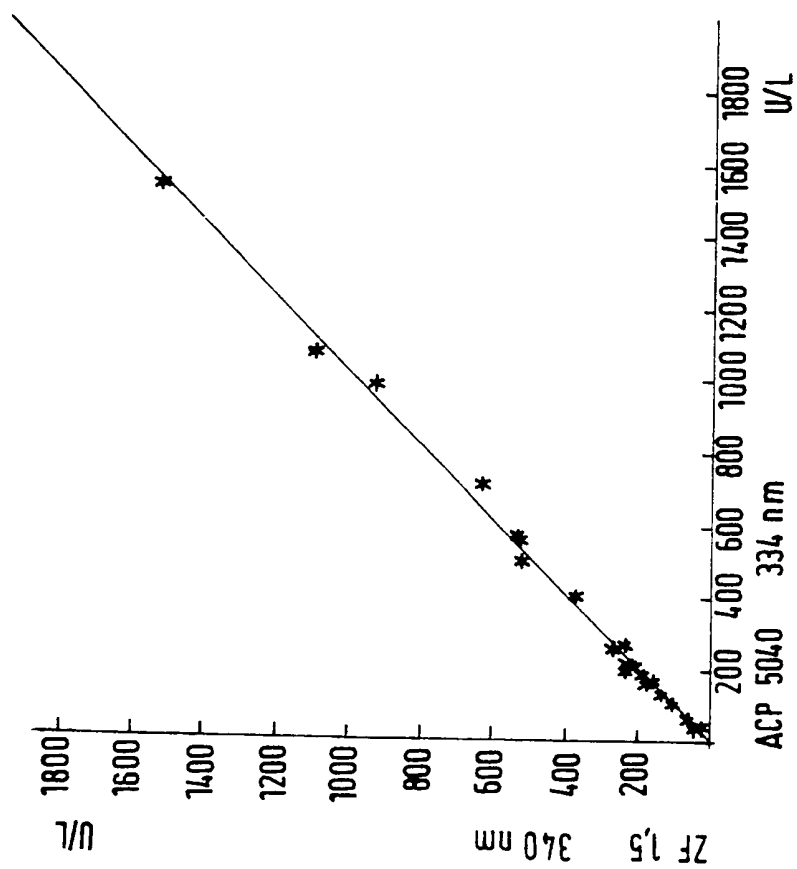
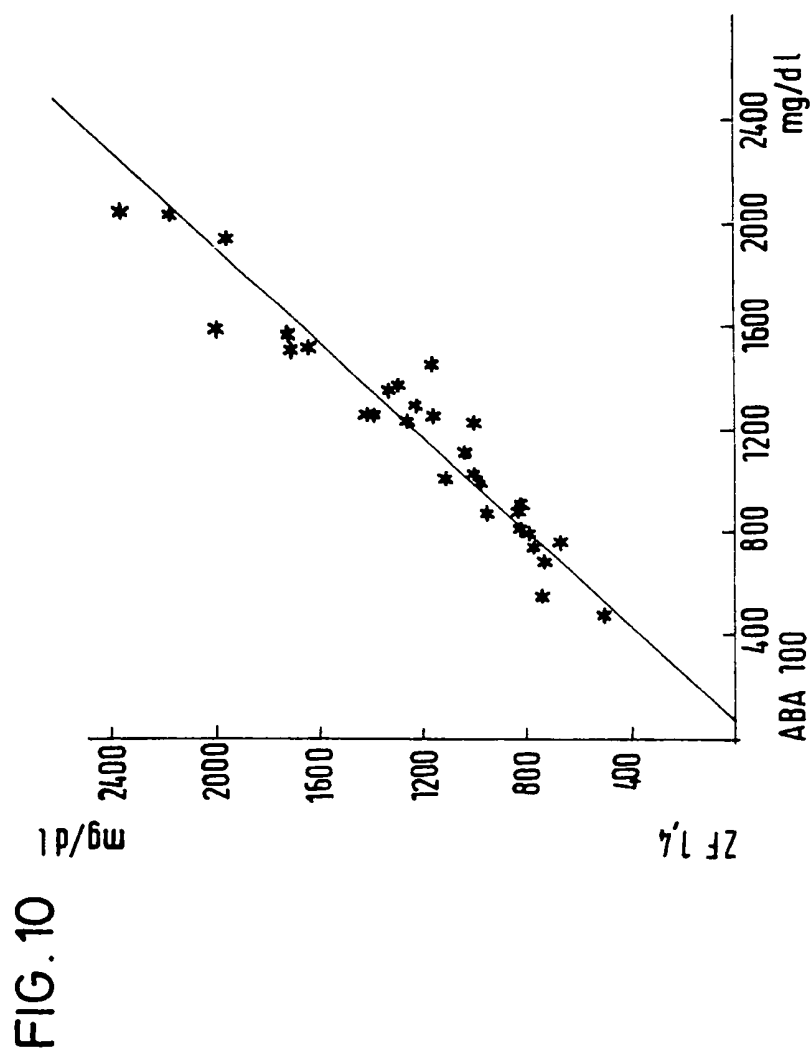


FIG. 9





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0073513
Nummer der Anmeldung

EP 82 10 7972.0

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
A	DE - A - 1 944 246 (MINNESOTA MINING) * Ansprüche 1, 5 *	1,7	G 01 N 33/52 G 01 N 31/22 G 01 N 21/07
A	DE - A1 - 2 536 886 (DAMON CORP.) * Ansprüche 1, 5; Fig. 4, 5 *	1	
A	US - A - 3 999 868 (M. SANZ et al.) * Zusammenfassung *	7	
	& DE - A - 2 552 883		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
A	US - A - 4 244 916 (J. GUIGAN) & DE - A - 2 835 362		G 01 N 21/07 G 01 N 31/22 G 01 N 33/52
A,D	EP - A1 - 0 014 797 (EASTMAN KODAK CO.)		
A,D	DE - A1 - 2 927 345 (TECHNICON INSTRUMENTS CORP.)		
			KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
			X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie

Y

Der vorliegende Recherchenbericht ist...